

# GIẢI MÃ VÀ PHÂN TÍCH GEN S1 CỦA CHỦNG VIRUS PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA GÂY BỆNH TIÊU CHẢY CẤP TRÊN LỢN TẠI TỈNH HƯNG YÊN NĂM 2023

Lưu Minh Đức<sup>1,2</sup>, Đỗ Thị Roan<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Khuê<sup>1,2</sup>, Don Nguyen<sup>3</sup>, Đoàn Thị Thanh Hương<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Squalicum High School Bellingham, Washington, USA

## TÓM TẮT

Virus PED gây bệnh tiêu chảy cấp chủ yếu ở lợn con chưa cai sữa. Tỷ lệ nhiễm bệnh trong đàn khá cao, tỷ lệ chết cũng tương đối cao gây nên nhiều thiệt hại cho ngành chăn nuôi. Kích thước hệ gen virus khoảng 28 kb mã hóa cho các gen quan trọng cho quá trình nhân bản và hoàn thiện cấu tạo virus. Gen kháng nguyên spike chứa tiểu phần S1 bao gồm phần protein dẫn và hai vùng thụ thể liên kết. Gen S1 của chủng PEDVHY1 và PEDVHY2 thu nhận tại Hưng Yên năm 2023 đều có kích thước 2205 nucleotide mã hóa cho 735 amino acid thuộc genotype G2b. Protein S1 chứa nhiều đột biến, đặc biệt là đột biến chèn đoạn và xóa đoạn so với chủng virus nhược độc vaccine. Vùng gen S1 của hai chủng nghiên cứu ít có sai khác hơn so với các chủng thuộc genotype khác. Phân tích phả hệ nguồn gốc cho thấy hai chủng PEDV nghiên cứu có quan hệ gần gũi với nhau trong cây phả hệ và cùng nhóm với các chủng PEDV thu thập tại Việt Nam thu nhận trong giai đoạn 2013 đến 2018, thuộc genotype G2b, khác nhóm với chủng virus vaccine DR13 và CV 777 nhược độc.

*Từ khóa:* Gen S1, genotype, Hưng Yên, PEDV.

## MỞ ĐẦU

Bệnh tiêu chảy trên lợn (PED-Porcine Epidemic Diarrhea) do virus tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV-Porcine Epidemic Diarrhea Virus) gây ra. Đây là một bệnh truyền nhiễm với tốc độ lây lan nhanh, lợn mắc bệnh có triệu chứng nôn mửa, tiêu chảy cấp tính, mất nước nghiêm trọng dẫn đến tử vong. Tỷ lệ tử vong của lợn dưới một tuần tuổi đặc biệt cao, tỷ lệ tử vong của lợn trưởng thành thấp hơn (Pospischil *et al.*, 2002).

Bệnh PED lần đầu tiên xuất hiện tại Anh vào năm 1971, sau đó nhanh chóng lan ra các khu vực châu Âu bao gồm Thụy Sĩ, Đức, Pháp, Hà Lan và Bulgaria (Pensaert, De Bouck, 1978). Tại châu Á, PED lần đầu tiên được ghi nhận ở Nhật Bản vào năm 1982, sau đó là hàng loạt các quốc gia lớn như Trung Quốc năm 1986, Ấn Độ năm 2003 và Thái Lan năm 2007 (Temeeyasen *et al.*, 2013). Năm 2013, một đợt bùng phát dịch lớn đã xảy ra tại Mỹ, khiến 8 triệu con lợn mới sinh tử vong (Stevenson *et al.*, 2013). PEDV được báo cáo tại Việt Nam lần đầu tiên vào năm 2009 và các nghiên cứu cho thấy chủng PEDV gây nên đợt bùng phát dịch bệnh có mối quan hệ họ hàng với các chủng PEDV có nguồn gốc Trung Quốc (Nguyễn Tất Toàn *et al.*, 2012; Duy *et al.*, 2013). Cho đến nay, hầu hết các khu vực chăn nuôi lợn tại cả nước đều ghi nhận sự có mặt của PEDV. Mặc dù đã được sử dụng vaccine nhưng nhiều trang trại vẫn xảy ra bệnh gây thiệt hại rất nặng nề. Từ đó cho thấy các chủng virus thực địa đã biến đổi về đặc tính di truyền, dẫn đến không còn tương đồng về tính kháng nguyên-miễn dịch với các chủng virus vaccine đang sử dụng.

PEDV là một loại virus RNA sợi đơn dương, thuộc phân chi *Pedecovirus*, chi *Alphacoronavirus* trong họ *Coronaviridae*, thuộc bộ *Nidovirales* (Schoch *et al.*, 2020). Virus có cấu trúc hình cầu hoặc đa hình với đường kính 95–190 nm, có vỏ bọc ngoài cùng bao gồm các phần nhô ra hình gậy, hình tam giác có chiều dài 18–23 nm. Bộ gen PEDV dài khoảng 28 kb, bao gồm 7 khung đọc mở (ORF), được sắp xếp theo thứ tự 5'UTR-ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-N-3'UTR và đuôi poly (A) (Lee 2019). ORF1a, ORF1b chiếm khoảng 2/3 bộ gen, ở vị trí gần đầu 5' và mã hóa 16 protein phi cấu trúc (nsps). ORF3 nằm giữa gen S và E có vai trò mã hóa các protein phụ, đồng thời là yếu tố quyết định độc lực ở PEDV. Gen E giúp hình thành và giải phóng vỏ virus (Park *et al.*, 2008). Gen S mã hóa glycoprotein, được chia thành miền S1 và S2, đóng vai trò quan trọng trong liên kết với các thụ thể tế bào. Đặc biệt vùng gen S1 kích thích vật chủ sản xuất kháng thể trung hòa và là vùng có nhiều đột biến nhất trong hệ gen nên được sử dụng chủ yếu cho các nghiên cứu về dịch tễ học phân tử, phả hệ nguồn gốc và phát triển vaccine thế hệ mới (Sun *et al.*, 2007). Mặc dù PEDV được báo cáo chỉ có một kiểu huyết thanh, nhưng về mặt di truyền được chia thành hai nhóm: nhóm 1 (Genotype1: là nhóm cổ điển) và nhóm 2 (Genotype 2: là nhóm độc lực cao) (Li *et al.*, 2012). Việc bổ sung thêm các nghiên cứu về đặc điểm phân tử, di truyền của virus là vô cùng cần thiết để phục vụ cho công tác phòng bệnh. Để góp phần tìm hiểu rõ hơn về các chủng PEDV đang lưu hành, chúng tôi tiến hành giải mã và phân tích gen kháng nguyên S1 của một số chủng virus thực địa thu

thập tại Hưng Yên năm 2023. Đây là một trong các tỉnh phía Bắc có ngành chăn nuôi lợn phát triển cũng như bị ảnh hưởng nặng nề bởi dịch bệnh. Kết quả thu nhận được phân tích và so sánh với các chủng PEDV tham chiếu trên thế giới.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm là phân và niêm mạc ruột của lợn bệnh khoảng 2 đến 3 tuần tuổi có triệu chứng nôn, đi ngoài phân lỏng bị ốm hoặc đã chết. Mẫu bệnh phẩm được mổ khám tại các trang trại và giữ lạnh trước khi chuyển đến phòng Miễn dịch học, Viện Công nghệ Sinh học. Mẫu bệnh phẩm được pha loãng bằng đệm PBS để có dạng huyền phù. Li tâm hỗn hợp ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 30 phút. Dịch nổi phía trên được dùng để tách chiết RNA tổng số sử dụng bộ kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu được kiểm tra dương tính PEDV bằng cặp mồi chẩn đoán sẽ được lựa chọn để giải mã và phân tích gen S1.

### Tổng hợp cDNA, PCR và dòng hóa

cDNA được tổng hợp từ RNA virus (khoảng 1 µg) bằng bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng PCR được thực hiện nhằm chẩn đoán PEDV, sử dụng cặp mồi: PEDVF (5'-TTCTGAGTCACGAACAGCCA-3'), PEDVR (5'-CATATGCAGCCTGCTCTGAA-3') nằm trên gen S (Park *et al.*, 2008) thu sản phẩm PCR có kích thước 651 bp. Cặp mồi thứ 2 nhằm khuếch đại phân đoạn DNA chứa toàn bộ gen S1 gồm: PEDVS1F (5'-GCTAGTGCCTAATAATGACGCCA-3') và PEDVS1R (5'-ACAGCCTGTGTTGGTGTA-3') thu sản phẩm PCR có kích thước khoảng 2,4 kb. Phản ứng PCR được thực hiện trên tổng thể tích 50 µL bao gồm: 25 µL DreamTaq PCR Master Mix (2X), 2 µL mỗi loại mồi (10 pmol/µL) và 3 µL cDNA khuôn và nước tinh khiết cho đủ 50 µL. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: 95°C – 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ [95°C – 30 giây, 55°C – 30 giây, 72°C – 3 phút] và 72°C – 10 phút. Sản phẩm PCR dương tính có chất lượng tốt được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo, Mỹ) sau đó gắn vào vector tách dòng bằng bộ kit TA Cloning™ Kit (Thermo, Mỹ). Sản phẩm ligation được chuyển nạp vào tế bào khả biến DH5α.

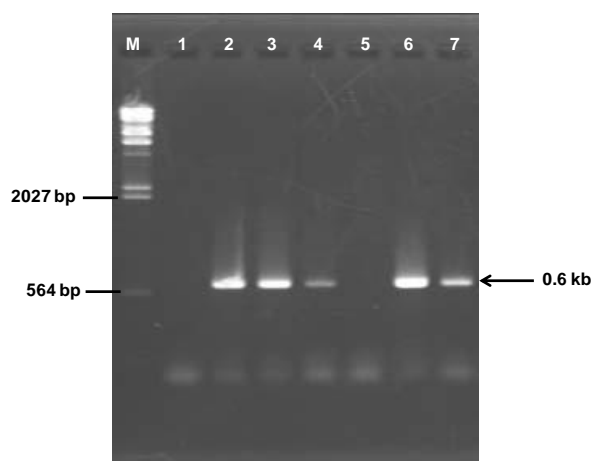
### Phân tích trình tự gen và phả hệ nguồn gốc

DNA plasmid tái tổ hợp được giải trình tự bằng kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Thermo fisher, Mỹ). Để thu được toàn bộ chuỗi DNA từ DNA plasmid trên, chúng tôi thiết kế thêm một mồi bên trong gen S1 (PEDVS-F1: 5'-AATTGCATTGGTATGCTGC-3') để giải trình tự. Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình Seqed1.3, so sánh bằng chương trình AssemblyLIGN1.9 và MacVector8.2 (Accelrys Inc). Các trình tự tương ứng với vùng gen S1 đăng ký tại Ngân hàng gen được sử dụng để so sánh đối chiếu với chuỗi gen nghiên cứu, sử dụng chương trình GENEDOC2.7 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Phân tích phả hệ nguồn gốc bằng chương trình MEGAX sử dụng phương pháp kết nối liền kề (Neighbor-joining) với giá trị bootstrap 1000 lần lặp lại (Kumar *et al.*, 2018).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả sàng lọc mẫu bệnh phẩm có chứa PEDV

Bằng cặp mồi chẩn đoán, chúng tôi phát hiện 5 mẫu dương tính với PEDV, là các mẫu cho sản phẩm PCR kích thước khoảng 0,6 kb đúng như dự tính (Hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di phát hiện PEDV bằng cặp mồi chẩn đoán PEDVF-PEDVR

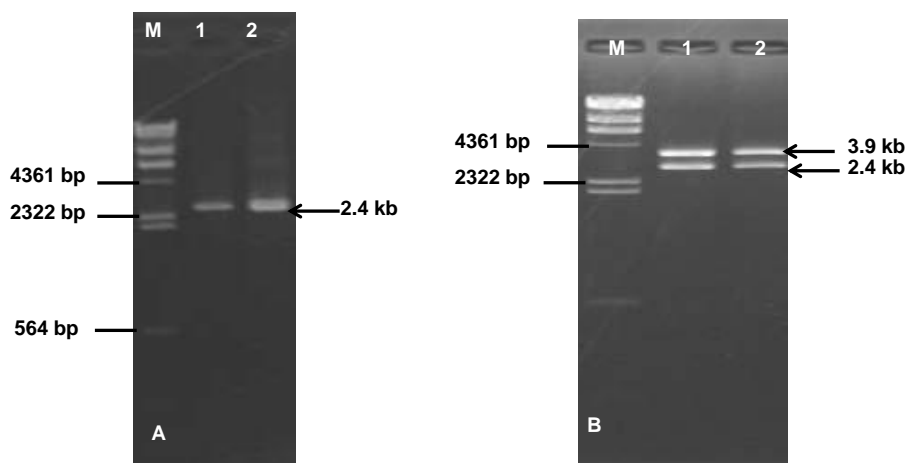
Giếng M: Thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme HindIII). Giếng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: Kết quả PCR bằng cặp mồi chẩn đoán của các mẫu PEDV thu nhận tại các trang trại đại diện cho các mẫu nghiên cứu.

Trong năm mẫu dương tính, chúng tôi lựa chọn hai mẫu có chất lượng tốt nhất và đại diện cho hai huyện khác nhau của Hưng Yên (là mẫu số 2 và mẫu số 6) để giải mã gen S1. Mẫu được ký hiệu là PEDVHY1 và PEDVHY2. Hai mẫu này sẽ được dùng để nhân gen S1 bằng cặp mồi đặc hiệu PEDVS1F - PEDVS1R.

### Kết quả thu nhận và giải trình tự gen S1

Sản phẩm PCR gen S1 của hai chủng PEDVHY1 và PEDVHY2:

Kết quả điện di sản phẩm PCR gen S1 và sản phẩm cắt DNA plasmid tái tổ hợp bằng enzyme giới hạn *EcoRI* được trình bày trong Hình 2. Sản phẩm PCR thu được từ mẫu 2 và mẫu 6 (tương ứng với mẫu bệnh phẩm ký hiệu PEDVHY1 và PEDVHY2) có chất lượng tốt, dòng hóa thành công vào vector pCR2.1. DNA plasmid tái tổ hợp được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *EcoRI* cho hai băng, một băng có kích thước 3.9 kb là vector pCR2.1, một băng có kích thước khoảng 2.4 kb bằng kích thước sản phẩm PCR gen S1 đem dòng hóa. Các DNA plasmid này sẽ được chọn để giải trình tự.



**Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR thu toàn bộ gen S1 của 2 chủng PEDV nghiên cứu**

*Giếng M: thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme HindIII).*

*Hình 2A: Giếng 1: kết quả PCR khuếch đại gen S1 của mẫu PEDVHY1; Giếng 2: kết quả PCR khuếch đại gen S1 của mẫu PEDVHY2*

*Hình 2B: Giếng 1: Kết quả điện di DNA plasmid của chủng PEDVHY1 cắt bằng enzyme giới hạn EcoRI; Giếng 2: Kết quả điện di DNA plasmid của chủng PEDVHY2 cắt bằng enzyme giới hạn EcoRI.*

DNA plasmid được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả đã thu nhận được toàn bộ gen S1 của hai chủng PEDVHY1 và PEDVHY2, gồm 2205 nucleotide mã hóa cho 735 amino acid.

Trình tự amino acid (suy diễn) của hai chủng nghiên cứu được so sánh với các chủng: XJ-YLGL-2022021, IBT-VN, HBEZ3, X-J-WLMQ, KNU-1308, DR13 wild type (G1a), CV777 wild type (G1a), DR13 nhược độc (G1b), CV777 nhược độc (G1b) đang được sử dụng làm vaccine hiện nay (Bảng 1).

Kết quả cho thấy hai chủng nghiên cứu chỉ sai khác nhau ở bốn vị trí amino acid (L120R, E484P, K638E và P720S) trên protein S1 trong khi chứa nhiều sai khác lớn (xóa đoạn, chèn đoạn) so với các chủng virus nhược độc vaccine.

Protein S1 chứa tổng số 71 vị trí sai khác về amino acid giữa các chủng đại diện cho các genotype. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu các sai khác amino acid giữa chủng CV777 thực địa (AF353511) (G1a), CV777 nhược độc vaccine (KT323979) (G1b), DR13 thực địa (JQ023162) (G1b) thu nhận tại Hàn Quốc năm 2009, DR13 nhược độc vaccine ((JQ023162) (G1b), HBZ3 thực địa (KY775054) thu nhận tại Trung Quốc năm 2016 (G2c), XJ-WLMQ-202203 (OR026668) thu nhận tại Trung Quốc năm 2022 (G2a), KNU-1308 (KJ451043) thu nhận tại Hàn Quốc năm 2013 (G2b), IBT-VN (MT198679) thu nhận tại Việt Nam năm 2018 và hai chủng nghiên cứu là PEDVHY1, PEDVHY 2 thu nhận tại tỉnh Hưng Yên năm 2023.

Tiểu phần protein S1 có chứa chuỗi peptide tín hiệu (SP), hai vị trí liên kết thụ thể: thụ thể đầu tận N (S1-NTD) và thụ thể đầu tận C (S1-CTD) bao trùm cả vùng COE (CO-26K equivalent).

Trong vùng peptide tín hiệu, các chủng virus thuộc genotype G1 chứa ba vị trí sai khác về amino acid so với các chủng virus thuộc genotype G2 (aa 2: R/T↔K/S, aa 5: I↔N/T, aa 15: P/L↔S).

Trong vùng liên kết thụ thể thứ nhất (S1-NTD) phát hiện 34 sai khác lớn về amino acid giữa các genotype. Đồng thời xuất hiện đột biến chèn amino acid của chủng virus thực địa so với chủng vaccine tại vị trí 56 (I/T), 139 (D/N)

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

và 157 (Y/H). Tại vị trí amino acid 59 – 61, chủng thực địa được chèn thêm 3 amino acid (HGV/QGV) so với chủng vaccine. Trong khi đó, chủng thuộc G1a và G1b lại có thêm 2 amino acid (DI/NI) ở vị trí 163 – 164 so với chủng thuộc G2a, G2b, G2c. Tại các vị trí khác là các đột biến điểm đặc trưng giữa các genotype (Bảng 1). Các đột biến chèn/xóa nằm chủ yếu ở vùng siêu biến đổi của chuỗi peptide S1.

Trong vùng liên kết thụ thể thứ 2 (S1-CTD) chứa 7 sai khác, trong đó chủng CV777 (G1a) thực địa chứa nhiều sai khác nhất so với các chủng còn lại. Tại vị trí 554, 599, 638, chủng virus vaccine hoàn toàn khác với hai chủng virus nghiên cứu. Đặc biệt, ở vị trí 638 chỉ riêng chủng PEDVHY1 là K trong khi các chủng khác thuộc cùng genotype 2 là E và các chủng thuộc genotype 1 là Q/E.

Epitope COE-CO26K là một trong những epitope trung hòa có trên protein S1 của PEDV. Amino acid tại vùng epitope này có sự đương đồng cao giữa các chủng PEDV thuộc nhóm G2 nhưng có nhiều vị trí sai khác so với nhóm G1. Các chủng PEDV thuộc nhóm G2 là những chủng có độc lực cao, đang lưu hành hiện nay tại nhiều quốc gia trên thế giới. Kết quả nghiên cứu cho thấy hai chủng PEDV nghiên cứu là những chủng có độc lực cao, có nguy cơ lây lan cao tại các trang trại chăn nuôi lợn.

Những sai khác kể trên giữa các chủng vaccine và chủng thực địa có thể là nguyên nhân dẫn đến việc virus tăng hay giảm khả năng liên kết với tế bào chủ, ảnh hưởng đến khả năng bảo hộ của vaccine.

So sánh tỷ lệ đồng nhất nucleotide dựa trên trình tự gen S1 cho thấy, tỷ lệ đồng nhất nucleotide giữa chủng PEDVHY1 và chủng PEDVHY2 cao, 99.66%. Tuy nhiên, khi so sánh với một số chủng PEDV phân lập tại Việt Nam giai đoạn 2013 đến 2018 thì tỷ lệ tương đồng đạt thấp hơn, dao động từ 96.55% đến 97.32%. Điều này cho thấy đã có sự biến đổi trong gen kháng nguyên S1 của PEDV thực địa đang lưu hành tại Việt Nam so với các chủng trước đây.

**Bảng 1. Vị trí sai khác amino acid thuộc protein S1 giữa các chủng PEDV đại diện các genotype và hai chủng nghiên cứu**

Vị trí (CV777(G1a))	1-SP-19		S1-NTD																			
	2	5 10 15	27-29	30	56	57	59-61	62	64	68-72	74	82	84	86	87	89	118	120	132	133	138	139
CV777(G1a)	R	I L P	QST	T	-	M	---	S S	GTGIE	A	L	Y	D	S	Q	N	I	K	T	V	-	Y
DR3(G1a)	R	I F L	QST	I	-	M	---	S S	GTGIE	D	L	Y	D	S	Q	N	I	K	T	V	-	Y
CV777 (at) (G1b)	T	I F L	QST	I	-	M	---	S S	GTGIE	D	L	Y	D	S	Q	S	I	K	T	V	-	-
DR3(at) (G1b)	T	I F L	QST	I	-	M	---	S S	GTGIE	D	L	Y	D	S	Q	S	I	K	T	V	-	-
HBEZ3 (G2c)	K	N F S	QST	I	-	M	---	S S	GTGIE	A	L	Y	D	A	Q	N	I	K	T	V	-	Y
XJ-WLMQ (G2a)	K	T F S	SAN	T	I	E	HGV	N T	AGQHP	A	L	H	R	G	H	N	T	N	T	A	D	H
KNU-1308 (2b)	S	T F S	SAN	T	I	E	QGV	N T	AGQPH	A	V	H	R	G	H	N	T	K	T	A	N	H
IBT-VN	S	T F S	SAN	T	I	E	QGV	N T	AGQPH	A	L	H	R	G	H	N	T	K	T	A	D	H
PEDVHY1	S	T F S	SAN	T	T	E	QGV	N T	AGQHP	A	L	H	R	G	H	N	T	K	A	A	N	H
PEDVHY2	S	T F S	SAN	T	T	E	QGV	N T	AGQHP	A	L	H	R	G	H	N	T	K	A	A	N	H

Vị trí (CV777(G1a))	S1-NTD												S1-CTD (COE-CO26K)							
	158	159	160-162	163-164	187	201-203	211	228	230-231	237	248-249	270	522	541	554	599	610	617	638	640
CV777(G1a)	M	R	DGK	DI	L	RRS	T	Y	EP	T	DS	L	A	F	T	G	A	L	E	I
DR3 (G1a)	L	Q	DGK	NI	L	NRS	T	Y	EP	S	DS	L	A	F	T	G	E	F	E	V
CV777 (at) (G1b)	L	Q	DGK	NI	I	NRS	T	Y	EP	S	DS	L	A	F	T	G	E	F	Q	V
DR3(at) (G1b)	L	Q	DGK	NI	I	NRS	T	Y	EP	S	DS	L	A	F	T	G	E	F	Q	V
HBEZ3 (G2c)	M	Q	DGK	NI	L	NRS	T	Y	EP	S	DS	L	S	F	S	S	E	F	E	V
XJ-WLMQ (G2a)	M	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QL	L	EL	L	S	L	S	S	E	F	E	V
KNU-1308 (2b)	M	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP	L	S	F	S	S	E	F	E	V
IBT-VN	M	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP	L	A	F	S	S	E	F	E	V
PEDVHY1	M	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP	V	A	F	S	S	E	F	K	V
PEDVHY2	M	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP	V	A	F	S	S	E	F	E	V

Chú thích: vị trí amino acid trong bảng 2.1 là vị trí của chủng CV777 thực địa (AF353511).

So sánh với các chủng thuộc genotype G1 (cường độc và vaccine), hai chủng PEDV phân lập tại Hưng Yên năm 2023 có tỷ lệ tương đồng thấp (từ 90.79% đến 91.12%). Kết quả cho thấy có sự khác biệt đáng kể về thành phần nucleotide giữa các chủng PEDV thuộc các genotype khác nhau, từ đó thấy được tầm quan trọng của công tác giám sát dịch tễ học phân tử và sử dụng vaccine phòng bệnh PED tại Việt Nam.

**KẾT QUẢ PHÂN TÍCH PHẢ HỆ NGUỒN GỐC**

Cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự gen S1 của 54 chủng PEDV, trong đó có hai chủng nghiên cứu PEDVHY1 và PEDVHY2, 52 chủng còn lại đại diện cho các genotype đã và đang lưu hành trên toàn cầu. Các chủng tham chiếu được tải xuống từ Ngân hàng gen NCBI theo mã số GenBank của từng chủng.

Cây phả hệ gồm năm nhóm chính tương ứng với năm genotype: G1a, G1b, G2a, G2b, G2c (Hình 3).

Nhóm thứ nhất gồm 29 chủng PEDV thuộc genotype G2b, bao gồm các chủng virus phân lập tại nhiều quốc gia bao gồm: Mỹ, Hàn Quốc, Mexico, Trung Quốc, Việt Nam (từ năm 2013 đến năm 2018), và hai chủng PEDVHY1 và PEDVHY2 thu nhận mới năm 2023 tại tỉnh Hưng Yên trong nghiên cứu này. Điều này chứng tỏ sự hiện diện của PEDV G2b khắp toàn cầu trong thời gian dài và tồn tại cho tới tận ngày nay.

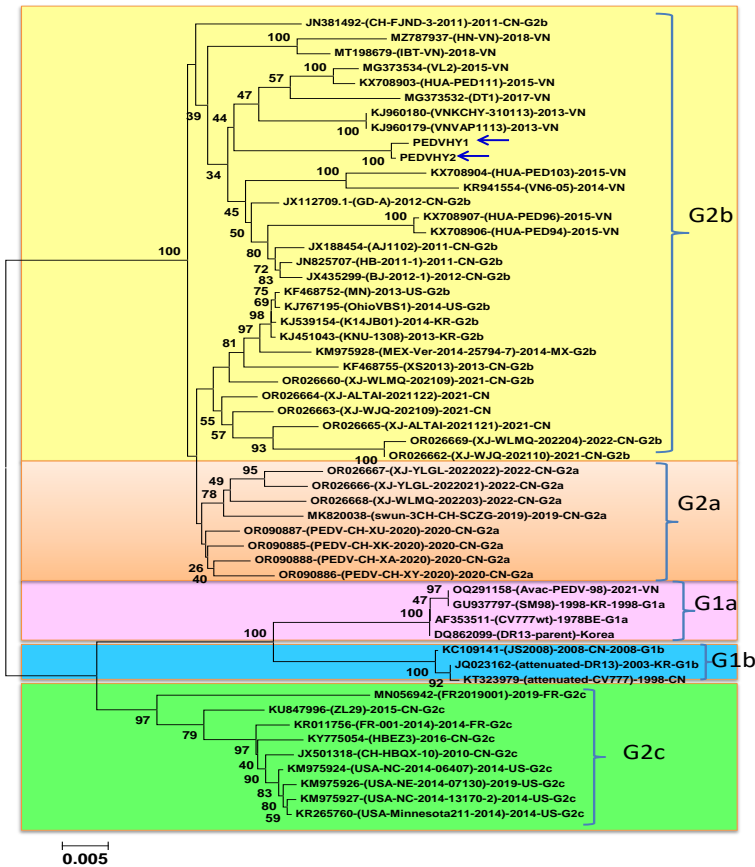
Nhóm thứ hai gồm các chủng thuộc genotype G2a. Nhóm này gồm các chủng của Trung Quốc phân lập trong khoảng 4 năm trở lại đây gây ra nhiều ổ dịch lớn tại Trung Quốc và lan sang các nước lân cận. Tuy nhiên, tại Việt Nam vẫn chưa ghi nhận thấy sự lưu hành phổ biến của các chủng PEDV thuộc genotype G2a này.

Nhóm thứ ba gồm các chủng PEDV thuộc genotype G1a. Nhóm này chứa chủng PEDV cổ điển CV777 phân lập từ năm 1978 tại Bỉ. Ngoài ra còn có các chủng phân lập tại Hàn Quốc năm 1998 và phân lập tại Đan Mạch phân lập năm 2017. Chủng Avac-PEDV-98 phân lập năm 2021 của Việt Nam thuộc nhóm này.

Nhóm thứ tư gồm các chủng PEDV thuộc genotype G1b. Nhóm này chứa các chủng virus vaccine nhược độc được biến đổi từ các chủng cường độc thuộc genotype G1a. Trong đó chủng CV777 đại (genotype G1a) sau quá trình nhược độc hóa thành chủng CV777 nhược độc thuộc G1b, chủng DR13 có nguồn gốc G1a, sau khi cấy chuyển 100 đời đã thành chủng nhược độc DR13 thuộc G1b. Đây là hai trong số nhiều chủng virus vaccine đang được sử dụng rộng rãi hiện nay.

Nhóm thứ năm gồm các chủng PEDV thuộc genotype G2c. Nhóm này gồm các chủng thu nhận tại Mỹ, Pháp, Trung Quốc từ khoảng những năm 2010 trở lại đây.

Hai chủng PEDV nghiên cứu (PEDVHY1 và PEDVHY2) phân lập năm 2023 tại tỉnh Hưng Yên thuộc genotype G2b, không cùng nhóm với hai chủng virus vaccine CV777 và DR13. Điều này là nguyên nhân dẫn đến việc đàn lợn vẫn mắc bệnh mặc dù đã sử dụng vaccine để phòng bệnh.



**Hình 3. Phả hệ nguồn gốc PEDV dựa trên trình tự gen S1**

Chú thích: Các nhóm khác nhau được đánh dấu bằng màu nền khác nhau. Chủng nghiên cứu PEDVHY1 và PEDVHY2 được đánh dấu bằng hình mũi tên.

**KẾT LUẬN**

Nghiên cứu đã giải mã và phân tích trình tự gen S1 của hai chủng PEDV thu nhận tại tỉnh Hưng Yên năm 2023. Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc cho thấy cả hai chủng PEDV nghiên cứu đều thuộc genotype G2b, là chủng virus đang lưu hành phổ biến hiện nay ở Việt Nam và trên thế giới. Hai chủng PEDV thực địa có 45 vị trí sai khác về amino acid trong protein kháng nguyên S1 so với các chủng PEDV thuộc các genotype khác và với hai chủng virus vaccine đang sử dụng hiện nay.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được tài trợ từ Nhiệm vụ Quỹ gen cấp quốc gia “Khai thác và phát triển nguồn gen virus (CSFV và PEDV) để chế tạo kit chẩn đoán và phục vụ sản xuất vắc-xin phòng bệnh dịch tả lợn cổ điển và bệnh tiêu chảy cấp ở lợn” mã số NVQG-2023/ĐT.04 do TS. Đoàn Thị Thanh Hương chủ nhiệm.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Duy DT, Toan NT, Puranaveja S, Thanawongnuwech R (2013). Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009-2010 outbreaks. *Thai J Vet Med*, 41: 55-56.
- Lee C (2019). Porcine Viruses: From Pathogenesis to Strategies for Control. Zakaryan H, editor. *Norfolk: Caister Academic Press; Porcine epidemic diarrhoea virus*: 107-134.
- Li W, van Kuppeveld FJM, He Q, Rottier PJM, Bosch BJ (2016). Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res*, 226: 117-127.
- Li W, Li H, Liu Y, Pan Y, Deng F, Song Y, Tang X, He Q (2012). New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis*, 18: 1350-1353.
- Park SJ, Moon HJ, Luo Y, Kim HK, Kim EM, Yang JS, Song DS, Kang BK, Lee CS, Park BK (2008). Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses. *Virus Genes*, 36: 95-104.
- Pensaert M, De Bouck P (1978) A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol*, 58: 243–247.
- Pospischil A, Stuedli A, Kiupel M (2002). Update on porcine epidemic diarrhea. *J Swine Health Prod*, 10: 81-85.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6):1547-1549.
- Schoch CL, Ciuffo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leippe D, McVeigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*: baaa062.
- Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Yoon KJ (2013). Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest of Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc*, 25(5): 649-654.
- Sun DB, Feng L, Shi HY, Chen JF, Liu SW, Chen HY (2007). Spike protein region (aa 636-789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies. *Acta Virol*. 51(3): 149-156.
- Temeeyasen G, Srijangwad A, Tripipat T, Tipsombatboon P, Piriyaopongsa J, Phoolcharoen W, Chuanasa T, Tantituvanont A, Nilubol D (2013). Genetic diversity of ORF3 and spike genes of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand. *Infect Genet Evol*, 21: 205-213.

**SEQUENCING AND ANALYSIS S1 GENE OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS ISOLATED IN HUNG YEN IN 2023**

Luu Minh Duc<sup>1,2</sup>, Do Thi Roan<sup>1,2</sup>, Nguyen Thi Khue<sup>1,2</sup>, Don Nguyen<sup>3</sup>, Doan Thi Thanh Huong<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>3</sup>*Squalicum High School Bellingham, Washington, USA*

**SUMMARY**

PED virus causes acute diarrhea mainly in unweaned piglets. The infection rate in herds and the mortality rate are high, causing a lot of damage to the livestock industry. The genome of virus is about 28 kb in size, encodes important genes for replication and complete virus creation. The antigen protein spike contains an S1 subunit contains a signal protein and two receptor-binding domains. The S1 genes of both strains PEDVHY1 and PEDVHY2 collected in Hung Yen in 2023 are 2205 nucleotides in size, encoding 735 amino acids and belong to genotype G2b. The S1 protein contains many mutations, especially insertion and deletion mutations compared to vaccine strains. The S1 gene region of the two studied trains has little difference, while they have many mutations compared to other genotypes. Phylogenetic analysis shows that the two studied PEDV strains are closely related in the family tree and are in the same group with Vietnamese strains collected from 2013 to 2018 belonging to genotype G2b, different genotype from attenuated vaccine virus strains: DR13 and CV777.

**Keywords:** S1 gene, genotype, Hung Yen, PEDV.

\* Author for correspondence: Tel: 0988904605; Email: doantthuong74@gmail.com